

## β-Indolylessigsäure-(IES)-abhängiger K<sup>+</sup>-H<sup>+</sup>-Austauschmechanismus und Streckungswachstum bei *Avena*-Koleoptilen

A β-Indole Acetic Acid (IAA) Dependent K<sup>+</sup>-H<sup>+</sup>-Exchange Mechanism as Related to Growth of *Avena* Coleoptiles

H.-P. Haschke und U. Lüttge

Fachbereich Biologie-Botanik, Technische Hochschule, Darmstadt

*Herrn Prof. Dr. Leo Brauner zum 75. Geburtstag gewidmet*

(Z. Naturforsch. **28 c**, 555–558 [1973]; eingegangen am 16. Mai/27. Juni 1973)

Indoleacetic acid, *Avena* coleoptiles, K<sup>+</sup>-H<sup>+</sup> ion exchange pump, growth

β-Indole acetic acid (IAA) ( $10^{-7}$ – $10^{-5}$  M) enhanced elongation of *Avena* coleoptiles is shown to be correlated with increased K<sup>+</sup> net influx and H<sup>+</sup> net efflux. The data suggest a 1:1 exchange of K<sup>+</sup> and H<sup>+</sup>. It is suggested that an IAA controlled K<sup>+</sup>-H<sup>+</sup>-exchange pump is involved in IAA regulation of elongation.

Die für das Streckungswachstum pflanzlicher Organe ausschlaggebende Zellwandplastizität hängt in hohem Maße von der Protonenkonzentration im Zellwand-Free-Space ab<sup>1–4</sup>. Nach einer Hypothese von Hager *et al.*<sup>4</sup> wird diese H<sup>+</sup>-Konzentration durch eine IES-abhängige und mit Energie aus Nucleosidtriphosphaten vom Stoffwechsel getriebene aktive H<sup>+</sup>-Abgabe kontrolliert. Der elektrochemische Ausgleich für die H<sup>+</sup>-Abgabe aus den Zellen könnte durch eine Anionenabgabe oder eine Kationen- (vornehmlich K<sup>+</sup>-) Aufnahme oder durch beides zugleich gewährleistet sein. Spezifische K<sup>+</sup>-H<sup>+</sup>-Austauschmechanismen wurden für Pflanzenzellen verschiedentlich beschrieben<sup>5</sup>. Elektrochemische Untersuchungen machen das Wirken einer IES-abhängigen K<sup>+</sup>-H<sup>+</sup>-Austauschpumpe an den Membranen von *Mnium*-Blattzellen sehr wahrscheinlich<sup>6</sup>. Die vorliegende Arbeit korreliert den K<sup>+</sup>-H<sup>+</sup>-Austausch mit dem Wachstum von *Avena*-Koleoptilen.

### Material und Methoden

Samen von *Avena sativa* (cv. Flemings Krone) wurden 6 Std. in gut durchlüftetem Wasser vorgequollen und anschließend im Dunkeln auf feuchtem Sägemehl angezogen. Nach 3 Tagen wurde zur Hemmung des Mesokotylwachstums, um gleichmäßige Keimung zu erreichen, für 1 Std. helles Rotlicht gegeben. Am fünften Tag nach der Aussaat wurden dann von ca. 30 bis 40 mm langen Keimlingen

Sonderdruckanforderungen an Prof. Dr. U. Lüttge, Fachbereich Biologie-Botanik, Technische Hochschule, D-6100 Darmstadt, Schnittspahnstraße 3–5.

Koleoptilenabschnitte gewonnen, wobei die Koleoptilen 3 mm unter der Spitze dekapiert und die folgenden 10 mm verwendet wurden. Die Abschnitte wurden 1 Std. lang in destilliertem Wasser gewässert und dann je 15 Stück (entsprechend ungefähr 100 mg Frischgewicht) in Erlenmeyerkolben mit 10 ml Versuchslösung überführt, in der sie für verschiedene Zeiten geschüttelt wurden. Die Versuchslösungen enthielten als K<sup>+</sup>-Quelle und zur leichten Pufferung 2 mM bzw. 10 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-Puffer (pH 6,0). 2% Glucose wurde zugegeben, um die Koleoptilen mit Substrat für das Wachstum zu versorgen. Die IES-Konzentrationen werden in den Tabellen und den Legenden der Abbildungen wiedergegeben.

Die Längenmessung erfolgte nach Durchlichtphotographie der Koleoptilenabschnitte. Die Negative wurden mit einem Vergrößerungsgerät projiziert und direkt ausgemessen.

Zur Messung der Protonenefflux wurde 2 ml der Probelösungen nach Versuchsende mit 1 mM KOH auf den Ausgangs-pH rücktitriert und aus dem Verbrauch an Lauge der H<sup>+</sup>-Nettoefflux aus den Koleoptilen berechnet.

Die Koleoptilen wurden dann für 15 min in kaltem bidestilliertem Wasser geschüttelt, um oberflächlich anhaftende Ionen (insbesondere K<sup>+</sup>) abzuwaschen. Ein Austausch des Free-Space, vor allem des Donnan Free Space – wie bei Experimenten mit radioaktiven Ionen durch Auswaschen in einer nicht markierten Lösung – war dadurch nicht möglich. Die Schlussfolgerungen der vorliegenden Arbeit beruhen in der Hauptsache auf der Analyse von Kinetiken, so daß sich durch unvollständige Free-Space-Auswaschung bedingte systematische Fehler aufheben.



Dieses Werk wurde im Jahr 2013 vom Verlag Zeitschrift für Naturforschung in Zusammenarbeit mit der Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e.V. digitalisiert und unter folgender Lizenz veröffentlicht: Creative Commons Namensnennung-Keine Bearbeitung 3.0 Deutschland Lizenz.

Zum 01.01.2015 ist eine Anpassung der Lizenzbedingungen (Entfall der Creative Commons Lizenzbedingung „Keine Bearbeitung“) beabsichtigt, um eine Nachnutzung auch im Rahmen zukünftiger wissenschaftlicher Nutzungsformen zu ermöglichen.

This work has been digitized and published in 2013 by Verlag Zeitschrift für Naturforschung in cooperation with the Max Planck Society for the Advancement of Science under a Creative Commons Attribution-NoDerivs 3.0 Germany License.

On 01.01.2015 it is planned to change the License Conditions (the removal of the Creative Commons License condition "no derivative works"). This is to allow reuse in the area of future scientific usage.

Anschließend an das Waschen wurden die Gewebestücke gewogen und entweder sofort extrahiert, oder sofern dies nicht möglich war, eingefroren.

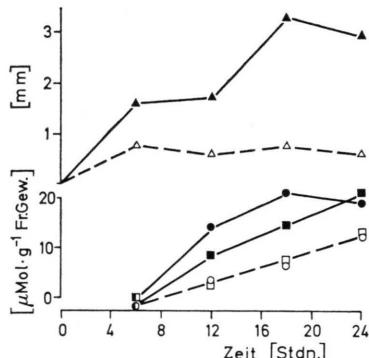
Zur Herstellung der Extrakte wurde das Gewebe in 5 ml 0,5-proz.  $HNO_3$  1 Stde. lang auf siedendem Wasserbad erhitzt, durch Watte filtriert und auf ein definiertes Volumen (meist 25 ml) aufgefüllt. Die Kaliumkonzentration der Extrakte wurde flammenphotometrisch gemessen (Eppendorf-Flammenphotometer). Die Chlorid-Bestimmung erfolgte elektrochemisch mit dem Chlorid-Titrator (Aminco Cotlove).

Zur Bestimmung der  $H^+$ -Austauschkapazität der Koleoptilzellwände wurden jeweils 2 g Fr.-Gew. Koleoptilen in 15 ml 50 mM KCl-Lösung homogenisiert und der unlösliche Niederschlag zweimal mit 5 mM KCl-Lösung gewaschen. Damit wurde ein Austausch anderer Kationen gegen  $K^+$  erreicht.

Der Niederschlag wurde nun in 30 ml 5 mM KCl-Lösung suspendiert und 10 ml (1 mM NaOH + 4 mM KCl) hinzugegeben. Die Suspension wurde mit 1 mM HCl titriert, wobei der pH registriert wurde. Zur Kontrolle wurden 10 ml (1 mM NaOH + 4 mM KCl) + 30 ml 5 mM KCl ohne Gewebe titriert. Aus der Differenz der beiden erhaltenen Neutralisationskurven wurde die  $H^+$ -Austauschkapazität des Gewebes errechnet. Bei dieser Methode wird der Anteil plasmatischer Bestandteile (Proteine) nicht erfaßt. Nach Pitman<sup>7</sup> ist der dadurch entstehende Fehler jedoch <10%.

## Ergebnisse und Diskussion

Abbn. 1 und 2 zeigen die Kinetik der Längenzunahme und der Netto- $K^+$ -Aufnahme bzw. der Netto- $H^+$ -Abgabe durch die *Avena*-Koleoptilen unter



Abbn. 1. Zeitabhängigkeit der IES-Wirkung in 2 mM K-Phosphatpuffer (Ausgangs-pH-Wert = 6,0). Offene Symbole Kontrollen ohne IES, ausgefüllte Symbole  $10^{-6}$  M IES.  $\triangle$ ,  $\blacktriangle$  = Längenänderung (dl),  $\circ$ ,  $\bullet$  =  $K^+$ -Nettoinflux (dK<sup>+</sup>),  $\square$ ,  $\blacksquare$  =  $H^+$ -Nettoefflux (dH<sup>+</sup>).

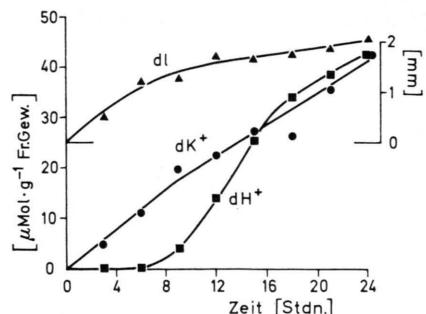


Abb. 2. Zeitabhängigkeit der IES-Wirkung ( $10^{-6}$  M) in 10 mM K-Phosphatpuffer (Ausgangs-pH-Wert = 6,0).  $\blacktriangle$  = Längenänderung (dl),  $\bullet$  =  $K^+$ -Nettoinflux (dK<sup>+</sup>),  $\blacksquare$  =  $H^+$ -Nettoefflux (dH<sup>+</sup>).

den gewählten Versuchsbedingungen.  $10^{-6}$  M IES fördert das Wachstum und steigert den  $K^+$ -Nettoinflux sowie den  $H^+$ -Nettoefflux. Das Streckungswachstum läßt sich unter den vorliegenden Versuchsbedingungen nach 3 – 6 Stdn. erkennen; der  $H^+$ -Flux und bei 2 mM K-Phosphatkonzentration auch der  $K^+$ -Flux werden dagegen erst nach  $t > 6$  Stdn. deutlich.

Zur Prüfung der Wirkung verschiedener IES-Konzentrationen wurde deshalb eine Versuchsdauer von 18 Stdn. gewählt. Tab. I zeigt die bei zwei verschiedenen K-Phosphatkonzentrationen erhaltenen IES-Effekte. Die optimalen IES-Konzentrationen für die Steigerung der Längenzunahme (dl) und der  $K^+$ - und  $H^+$ -Flux (dK<sup>+</sup>, dH<sup>+</sup>) liegen zwischen  $10^{-7}$  und  $10^{-5}$  M. Die Steigerung der Längenzunahme ist mit einer Steigerung des Netto- $K^+$ -Influx und des Netto- $H^+$ -Efflux korreliert. Daß das stärkste Streckungswachstum in Ansätzen beobachtet wurde, deren End-pH-Wert (nach 18 Stdn.) in der Nähe von 4 lag, deckt sich mit den Erfahrungen von Hager *et al.* (ref. 4: Abbn. 6 und 9). Danach liegt das pH-Optimum bei Kurzzeitversuchen zwischen 3,7 und 4. Der relative Effekt der IES auf das Wachstum ist um ein Vielfaches größer als die IES-Wirkung auf die Ionenfluxe. Offenbar führt eine relativ geringere Steigerung des  $H^+$ -Efflux zu Bedingungen in der Zellwand, die eine viel drastischere Wachstumsförderung möglich machen. Die relative IES-Förderung der  $K^+$ -Aufnahme und der  $H^+$ -Abgabe ist bei niedriger Ionenkonzentration in der Außenlösung (2 mM Phosphatkonzentration) durchwegs höher als bei hoher Außenkonzentration (10 mM Puffer). Dies stimmt mit den mit *Mnium*-Blättchen erhaltenen Ergebnissen qualitativ überein, wo bei 0,2 mM KCl oder  $K_2SO_4$  in der Außenlösung in Gegenwart von

Tab. I. Längenzunahme (dl), Kalium-, Wasserstoff- und Chloridionen-Nettofluxe ( $dK^+$ ,  $dH^+$ ,  $dCl^-$ ) in 18 Stdn. in Abhängigkeit von der IES-Konzentration. Positiver Flux: Ionenaufnahme, negativer Flux: Ionenausgabe durch die Koleoptilzellen. a: Außenlösung = 2 mM K-Phosphatpuffer, b: Außenlösung = 10 mM K-Phosphatpuffer. Die Tabelle zeigt ferner die pH-Werte der Lösungen am Ende der Versuche (Zeitpunkt  $t_{18}$ ) und die Ladungsbilanz des  $K^+$ - $H^+$ -Austausches ( $dK^+ - dH^+$ ).

IES [Mol/l]	pH	Länge [mm]	$K^+$	$H^+$ [ $\mu$ Mol · g <sup>-1</sup> Frischgewicht]	$Cl^-$
<i>Ausgangswerte (t<sub>0</sub>)</i>	a 6,0 b 6,0	10 10	36,0 33,0		19,1 7,4
<i>Änderung nach 18 Stdn. (t<sub>18</sub>)</i>		dl	$dK^+$	$dH^+$	$dK^+ - dH^+$
0	a 4,4 b 5,2	0,62 (100) 1,50 (100)	+ 12,5 (100) + 22,4 (100)	- 12,7 (100) - 28,4 (100)	- 0,2 - 6,0
$10^{-7}$	a 3,9 b 5,3	3,75 (605) 3,21 (215)	+ 17,5 (140) + 22,4 (100)	- 15,8 (124) - 27,0 (95)	+ 1,7 - 4,6
$10^{-6}$	a 3,5 b 4,5	2,95 (475) 5,43 (360)	+ 18,9 (151) + 27,7 (124)	- 20,6 (162) - 36,2 (128)	- 1,7 - 8,5
$10^{-5}$	a 3,6 b 4,7	2,57 (415) 4,43 (295)	+ 20,4 (163) + 33,0 (147)	- 18,0 (142) - 34,2 (120)	+ 2,4 - 1,2
$10^{-4}$	a 4,3 b 5,3	1,16 (185) 3,89 (260)	+ 14,6 (117) + 26,6 (119)	- 8,9 (69) - 27,0 (95)	+ 5,7 - 0,4

$5 \cdot 10^{-7} - 5 \cdot 10^{-6}$  M IES Steigerungen der  $K^+$ -Aufnahme von bis zu 170% der Kontrollen beobachtet wurden, IES bei 10 mM Salzlösungen aber keinen signifikanten Effekt hatte<sup>6</sup>.

Ein wesentliches Resultat der Tab. I ist, daß unter allen Bedingungen kaum eine Differenz zwischen dem  $K^+$ -Influx und dem Protonenefflux ( $dK^+ - dH^+$ ) gefunden wird. (Siehe auch Abb. 1 und 2 bei  $t \geq 16$  Stdn.) Dies macht es sehr wahrscheinlich, daß bei *Avena*-Koleoptilen eine IES-abhängige  $K^+$ - $H^+$ -Austauschpumpe wirksam ist. Die Ladungsbilanz  $dK^+ - dH^+$  scheint im Rahmen der Meßfehler ausgeglichen zu sein. Eine besondere Rolle des Chlors wird nicht deutlich. Dadurch unterscheiden sich unsere Ergebnisse wesentlich von den Resultaten von Rubinstein und Light<sup>8</sup> und Bentrup *et al.*<sup>9</sup>, die eine IES-Wirkung auf den  $Cl^-$ -Transport nachweisen. Es kann sich dabei um eine andere Ionenpumpe handeln; viele Pflanzenzellen verfügen über mehrere voneinander unabhängige Ionenmembrantransportmechanismen. Zudem enthielt die Außenlösung bei unseren Versuchen kein  $Cl^-$ , der  $Cl^-$ -Efflux aus dem Gewebe wird durch IES nicht klar beeinflußt.

Wenn nach dem Modell von Hager *et al.* der IES-gesteuerte  $H^+$ -Efflux für die Steigerung des Streckungswachstums verantwortlich sein soll, wird man sich fragen, warum wir in unseren Versuchen bereits eine dl beobachten, bevor die Ansäuerung der Außenlösung ( $dH^+$ ) apparent wird. Die Cuticula der Koleoptilen könnte den Ionenaustausch zwischen den Koleoptilen und der Außenlösung verlangsamen. Innerhalb der Cuticula könnte ein geschlos-

sener Raum für die Ansäuerung der Zellwand entstehen. Entsprechend für das Funktionieren des Hager'schen Modells scheint nämlich nicht so sehr der pH-Wert der Außenlösung, sondern eher der  $H^+$ -Gehalt der Zellwand („Protonierung der Zellwand“) zu sein. Die Protonierung der Zellwand könnte beim aktiven  $H^+$ -Transport aus dem Plasma durch das Plasmalemma durchaus rascher voranschreiten, als sich das bei der Messung der LösungspH erkennen läßt. Unsere Titrationsversuche ergaben eine  $H^+$ -Austauschkapazität von  $6 \mu\text{eq} \cdot \text{g}^{-1}$  Fr.-Gew. Der  $H^+$ -Netto-Efflux liegt in der Größenordnung von  $1 - 1,5 \mu\text{eq} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$  Fr.-Gew. (s. Abb. 1 u. 2). Die beobachtete lag-Phase der Ansäuerung der Außenlösung von ca. 6 Stdn. wäre also dadurch so zu erklären, daß die austretenden  $H^+$ -Ionen zunächst an Festladungen in der Zellwand ausgetauscht werden und erst danach in die Lösung übertreten.

Tab. II zeigt, daß die IES-gesteigerte Längenzunahme der Koleoptilen viel mehr mit dem  $H^+$ -Efflux als mit dem LösungspH-Wert korreliert ist. Bei einer Steigerung des Verhältnisses Versuchs-

Tab. II. Längenzunahme (dl),  $H^+$ -Efflux und pH-Änderung (Ausgangs-pH = 6,0) bei verschiedenen Versuchslösungsvolumen: Gewebe-Verhältnissen (je 15 10 mm lange Koleoptilen in 10 bzw. 100 ml 2 mM K-Phosphatpuffer).

Volumen des Ansatzes [ml]	10	100
IES (Mol/l)	0	$5 \cdot 10^{-6}$
pH nach 24 Stdn.	5,15	4,66
dl nach 24 Stdn. [mm]	0,89	3,10
$dH^+$ in 24 Stdn. ( $\mu\text{equ} \cdot \text{g}^{-1}$ Fr. Gew.)	- 8,5	- 18,2
	-	- 28,4

lösungsvolumen: Gewebe ist die pH-Änderung bei gleichem oder größerem  $dH^+$  geringer, dennoch bleibt die Wachstumsförderung durch IES erhalten.

Eine Kontamination der Koleoptilen und Versuchsansätze mit möglicherweise auf IES ansprechenden Mikroorganismen konnte bei den vorliegenden Experimenten nicht vollkommen ausgeschlossen werden. Antibiotika sind bei Ionentransportuntersuchungen schwer zu verwenden, da sie oft auch den Ionentransport bei höheren Pflanzenzellen beeinflussen. Die gute Korrelation des beobachteten Ionenaustausches mit dem Wachstum der Koleoptilen (Tab. I) scheint gegen einen wesentlichen Beitrag von Mikroorganismen zu sprechen. Wäre die beobachtete, trotz Pufferung starke Ansäuerung der Versuchslösung (Tab. I) auf den Stoffwechsel von Bakterien zurückzuführen, hätte man ein Bakterienwachstum auch visuell beobachten müssen, die Versuchsansätze waren aber nie trüb. Wenn die gefundene Ansäuerung der Außenlösung durch die respiratorische  $CO_2$ -Abgabe von Mikroorganismen zu stande kommen sollte, wäre ferner nicht einzusehen, warum gerade eine äquivalente Menge  $K^+$  aufgenommen wird. Es besteht deshalb wohl kein Grund, den beobachteten  $K^+ - H^+$ -Austausch nicht als spezifische Eigenschaft der *Avena*-Koleoptilen ernsthaft in Betracht zu ziehen.

### Schlußfolgerung

Die beschriebenen Versuche zeigen, daß bei *Avena*-Koleoptilen  $\beta$ -Indolylsäure (IES) bei wachstumsfördernden Konzentrationen einen 1:1-Austausch von  $K^+$ - und  $H^+$ -Ionen fördert. Eine  $K^+ - H^+$ -Austauschpumpe ist deshalb sehr wahrscheinlich am Mechanismus der IES-Regulation des Wachstums beteiligt. Dieser Befund stützt die Hypothese von Hager *et al.*<sup>4</sup>, nach der IES als allosterischer Effektor einen stoffwechselabhängigen  $H^+$ -Abgabe-Mechanismus reguliert (Abb. 21 in ref. 4).  $K^+$  muß dabei zum Ladungsausgleich in die Zellen aufgenommen werden.

Wir danken Herrn Prof. Dr. A. Hager und Herrn Doz. Dr. R. Hertel für die Durchsicht des Manuskriptes, Herrn Prof. Dr. D. Köhler und Herrn Prof. Dr. M. G. Pitman für technische Hinweise und der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die Unterstützung der Arbeit.

*Notiz.* Nach Drucklegung wurde die folgende Untersuchung bekannt: I. Ilan, *Physiol. Plantarum* [Copenhagen] **28**, 146 [1973]. Der Autor zeigt bei *Helianthus annuus* ebenfalls einen IES-geförderten  $H^+ - K^+$ -Austausch. Er ist aber nicht der Meinung, daß dieser Ionentransport für das Wachstum verantwortlich sei, da keine klare Korrelation des Wachstums mit dem Lösungs-pH-Wert gefunden wurde. Ein möglicher  $H^+$ -Austausch in der Zellwand bei IES-gefördertem Wachstum wird von Ilan jedoch nicht berücksichtigt.

<sup>1</sup> A. Hager, Habil. Schrift, Naturw. Fakultät, Univ. München 1962.

<sup>2</sup> H. Menzel, Dissertation, Naturw. Fakultät, Univ. München 1966.

<sup>3</sup> D. L. Rayle, P. M. Haughton, and R. Cleland, *Proc. nat. Acad. Sci. USA* **67**, 1814 [1970].

<sup>4</sup> A. Hager, H. Menzel u. A. Krauss, *Planta* **100**, 47 [1971].

<sup>5</sup> R. J. Poole, *Ion transport in plants* (W. P. Anderson, ed.), p. 129, Acad. Press, London and New York 1973.

<sup>6</sup> U. Lüttge, N. Higinbotham, and C. K. Pallaghy, *Z. Naturforsch.* **27b**, 1239 [1972].

<sup>7</sup> M. G. Pitman, *Austral. J. biol. Sci.* **18**, 547 [1965].

<sup>8</sup> B. Rubinstein and E. N. Light, *Planta* **110**, 43 [1973].

<sup>9</sup> F. W. Bentrup, H. Pfrüner, and G. Wagner, *Planta* **110**, 369 [1973].